

ANTITUMOR AGENT

Patent Number: JP60149520
Publication date: 1985-08-07
Inventor(s): MORIOKA HAJIME; others: 04
Applicant(s):: AJINOMOTO KK
Requested Patent: JP60149520
Application Number: JP19840004400 19840113
Priority Number(s):
IPC Classification: A61K31/16
EC Classification:
Equivalents: JP1756009C, JP4047648B

Abstract

PURPOSE: To provide an antitumor agent containing trichostatin A as an active component.
CONSTITUTION: Trichostatin A of formula obtained by the cultivation of a trichostatin A-producing microbial strain belonging to Streptomyces genus (e.g. Streptomyces sioyaensis FERM-P No.7296) is used as an active component of the present antitumor agent. It has been found newly that the compound has strong effect to inhibit the growth of the mouse erythrocyte Friend cell transformed with Friend virus, mouse fibroblast cell M-MSV Balb3T3 transformed by the Moloney's strain of Murine sarcoma virus, HeLa cell of human cervical carcinoma cell, human leukemia cell, HL-60 cell and ML-1 cell. Dose: 1-2,000mg daily divided in several doses of 0.2-500mg each.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報 (A) 昭60-149520

⑬ Int.Cl. 1
 A 61 K 31/16
 // C 07 C 101/453

識別記号 廣内整理番号
 ADU 7330-4C

⑭ 公開 昭和60年(1985)8月7日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全 7 頁)

⑮ 発明の名称 抗腫瘍剤

⑯ 特 願 昭59-4400
 ⑰ 出 願 昭59(1984)1月13日

⑱ 発明者 森岡一 川崎市幸区鹿島田958
 ⑲ 発明者 武沢美佐子 横浜市戸塚区和泉町7317-16
 ⑳ 発明者 柴井博四郎 茅ヶ崎市若松町14-15
 ㉑ 発明者 石原勝 横浜市戸塚区和泉町7323-6
 ㉒ 発明者 木田隆夫 横須賀市湘南鷹取3-3-9
 ㉓ 出願人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

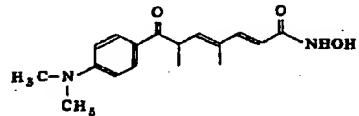
明細書

1 発明の名称

抗腫瘍剤

2 発明請求の範囲

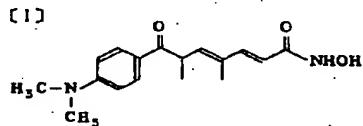
下記構造式で示される物質を含有する抗腫瘍剤



3 発明の詳細な説明

本発明は新規抗腫瘍剤、より詳しくは下記構造式 [I] で示されるトリコスタチン A を有効成分として含有する抗腫瘍剤に関する。

[I]



トリコスタチン A

これまでトリコスタチン A が抗腫瘍活性を示すことは知られていなかったが、本発明者は、トリコスタチン A が、フレンドウイルス (Friend virus) でトランシスフォームしたマウス赤芽球細胞 Friend 細胞、マリンザルコーマウイルス (Marine Sarcoma virus) のモロニー株 (Moloney) でトランシスフォームしたマウスの線維芽細胞 M-MSV-Balb 3T3、ヒト子宮頸癌細胞ヘラ (HeLa) 細胞、ヒト白血病細胞、HL-60 細胞および ML-1 細胞に対して強い生育阻害作用を有していることを初めて見い出し、この発見に基づき本発明を完成するに至った。

前記構造式 [I] で示されるトリコスタチン A は特に Friend 細胞、M-MSV-Balb 3T3 細胞、HeLa 細胞、HL-60 細胞及び ML-1 細胞に対して強い生育阻害作用を有しており、抗腫瘍剤として利用できるものである。

前記構造式で示されるトリコスタチン A は本発明者が見い出した方法で製造することができる。すなわち本発明において使用する微生物は、トリコスタチン A を生産する能力を有する微生物であ

特開昭60-149520(2)

り、具体的には土壌中より分離された微生物が使用される。本微生物をバージィーズ・マニアル・オブ・ディタミネイティア・バクテリオロジー8版(1974)に従って同定したところストレプトミセス・ショイアイエンシス FERM-P-7296 と同定した。

本発明においては上記菌株およびその人工ならびに自然変異株は勿論のこと、ストレプトマイセス属に属するトリコスタチンA生産菌のすべてが使用される。

本微生物を用いてトリコスタチンAを生産するにあたって用いられる培地は炭素源、窒素源及び無機塩類、更に必要に応じて有機微量栄養素を適宜含有する通常の液体培地が用いられる。

炭素源としては、例えばグルコース、フラクトース、マルトース、シュークロース、スター、デキストリン、澱粉加水分解物、魔糖等の炭水化物、グエン酸、コハク酸、フマル酸、酢酸等の有機酸及びグリセリン等のアルコール類が用いられる。窒素源としては例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、胡

麻アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等の硝酸塩、尿素、アンモニア水、アンモニアガス、アミノ酸類、さらにペプトン、大豆ホエー、大豆フレーク及びそれらの加水分解物等の蛋白質、米糠等が用いられる。その他無機塩としては例えはマンガン塩、リン酸塩が適宜用いられ、又有機微量栄養素としてはアミノ酸、ビタミン及びこれらを含有するペプトン、酵母エキス等が適宜用いられる。培養条件は、培地組成その他により異なるが、例えは通常pH 4.0~9.0、温度15~40°Cで振盪培養、通気搅拌培養等好気的条件下に培養が行われる。

本発明のトリコスタチンAはこのようにして培養して得られる培養液中及び菌体内に存在し、培養液よりトリコスタチンAを分離・採取する方法は酢酸エチル等の有機溶媒抽出法、臍相及び逆シリカゲル、セルロース等の吸着剤を用いる吸着クロマトグラフィー、グルーピング法、各種酵素に対する活性度の差を利用する方法等の公知の分離・

精製法を適宜組み合せて行われる。一方、菌体内に生成されたトリコスタチンAはクロロホルム等の有機溶媒で抽出した後上記の方法に従って精製分離される。

次に製造例を示す。

第1表に示した培地(pH 7.2) 100 mlを分注した500 ml培養フラスコを120°C 20分間殺菌して、これにストレプトミセス・ショイアイエンシス FERM-P-7296 の培養液 1 mlを接種し、27°Cで4日間培養した。一方300 ml容のステンレス・ジャーファーメンターの中に前記の培地を18 l入れ殺菌したものに上記の種母 2 lを接種しあく拌(350 rpm)、通気(1/2 vvm)し27°Cで3日間培養を続けれた。更にその20 lを2次種母として300 ml容のステンレスタンク中に上記組成の培地280 lを入れ殺菌したものに接種しあく拌(310 rpm)、通気(1/2 vvm)し、27°Cで3日間培養した。

第 1 表

グルコース	1.0	%
酵母エキス	0.2	%
KH ₂ PO ₄	0.1	%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	%
ペクツソイトン	0.7	%
ペクトベプトン	0.5	%
デンプン	2.0	%
アデカノール	0.05	%
(pH 7.2)		

280 lの培養液を遠心分離し、菌糸 1.3 kgと除菌液 260 lを得た。菌糸よりトリコスタチンAを含む区分を取得するには、以下の方法に従えばよい。

この菌糸 1.3 kgに、クロロホルム:メタノール(1:1)の混合液 60 lを加え室温で1時間攪拌した後、沪過により菌糸を除去した。^{FERM-P-7296}を含むクロロホルム-メタノール混合液を濾絞し、油状物質を得た。

除菌液 260 l 中よりトリコスタチンAを含む

特開昭60-149520(3)

区分を取得するには以下の方法に従えばよい。

吸着クロマトグラフィーカラム(オルガノ社製「アンバーライト XAD-7」)($15\text{cm}^{\phi} \times 67\text{cm}$)に吸着液 250ml を注ぎ込み、吸着クロマトグラフィーカラムに吸着しない物質を除去した。その後、吸着クロマトグラフィーカラムに 100ml メタノール 75ml を注ぎ込み 100ml メタノールで溶離されるトリコスタチンAを含む溶液を採取した。該区分をエバボレーターを用い常圧で濃縮し、 3.1ml の濃縮液を得た。菌糸をクロロホルム・メタノール抽出して得られた油状物質と除菌液中の吸着クロマトグラフィーカラムに吸着される物質で 100ml メタノールに溶離される区分については、以下に述べる共通のトリコスタチンAの単離精製工程を用いることができる。

以下、除菌液より得たトリコスタチンAを含む粗結晶中からのトリコスタチンAの単離精製工程について説明する。

上記濃縮液 3.1ml に酢酸エチル 6ml を加え常圧で 20 分間激しく振盪後静置し、酢酸エチル区分 5 ml

を分取した。次いで残液中に酢酸エチルを 6ml 加え、再び常圧で 20 分間激しく振盪後静置し、酢酸エチル区分 5ml を分取した。これら酢酸エチル区分を合せ本た様に、エバボレーターを用い常圧下で酢酸エチル区分を濃縮・乾固した。この濃縮・乾固したトリコスタチンAを含む区分を 100ml メタノール 200ml に溶解させた。次にグルーブクロマトグラフィー(「LR-20」ファルマシイ社製)カラム($30\text{cm}^{\phi} \times 800\text{cm}$)に上記~~トリコスタチンA~~を含む 100ml メタノール液を注いだ後、新たに 100ml メタノールを 30ml 注ぎ、グルーブを行ない、伊波を各々 100ml 毎に分取した。これらの伊波中からフレンド白血病細胞に対して生育阻害作用を有する画分 1ml を採取した。この画分を濃縮後、酢酸エチルとメタノールの混合浴媒(7.5:1) 10ml に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なう。酢酸エチル・メタノール(7.5:1)で展開後フレンド白血病細胞に対して生育阻害作用を有する画分 100ml を採取した。この画分を濃縮し約 50ml のトリコスタチンAの粗物

質を得た。さらにこの粗物質をシリカゲルの薄層クロマトグラフィーで分離精製しトリコスタチンA約 200mg を得た。

トリコスタチンAの物理化学的性状は以下の通りである。この性状から本物質は紗ら、ジャーナル・オブ・アンティバイオティックス¹⁹, 1(1979) (J. Antibiotics, N. Tanji et al. ¹⁹, 1(1976)) の報告するトリコスタチンAと同一であると確認できる。

①融点 m.p. $150\sim 151^\circ\text{C}$

②分子量 302 (FD-MASS法による)

③元素分析 C, 67.28%、H, 7.40%、N, 9.43%

④紫外線吸収スペクトル

λ_{max} EtOH 253 nm, 267 nm, 341 nm

⑤溶剤に対する溶解性

クロロホルム、酢酸エチル、アセトン、ベンゼンに可溶、水に不溶

⑥呈色反応

ドラグンドルフ反応 隅性

⑦ $^1\text{H-NMR}$ スペクトラム

第1回参照

⑧ $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトラム

第2回参照

トリコスタチンAの抗腫瘍活性を示す

(1) Friend細胞に対する生育阻害効果

Ham's F-12粉末培地(Gibco社製の細胞培養用培地成分) 10.4g 及び $\text{NaHCO}_3 1.4\text{g}$ を 1.0l の蒸留水に溶解し、ボアーサイズ $0.22\mu\text{m}$ のミリポアフィルターで無菌伊波し、これに無菌的に調製した牛胎児血清(Flow lab. 社製)を 100ml 添加して細胞培養用培地を調製した。この培地に、予め培養したフレンド白血病細胞(井川洋二、代謝、¹⁵, 145(1978)参照)を加え(細胞濃度: $1 \times 10^6/\text{ml}$)、この細胞懸濁液をマイクロテストプレート(Nunc社製、96穴)に 0.1ml 完全に分注し、炭酸ガスインキュベーター中(炭酸ガス濃度 5% 、温度 37°C)で 24 時間培養した。この培養液に、ストレプトミセス・シオイ・ア・エンシス FERM-P-7296 の発酵液より単離・精製されたトリコスタチンAを一定量含有する上記培地を 0.1ml 完全に加し、更に

特開昭60-148520(4)

Balb 3T3 細胞 (Aaronson and Rowe, Virology, 42, 9 (1970) 参照) に対する生育阻害度を第3表に示す。この実験では培地として MEM メルベッコ培地 (Gibco 社製) を用いた。

結果は第3表に示した。なお、表中の(−)は生育阻害がないことを示し、(++)はすべての細胞が死滅することを示す。

3日間培養を継続し、(トリパンブルーを用いる細胞染色法により生細胞数を計測し)トリコスタチンAのフレンド白血病細胞に対する生育阻害作用を調べた。その結果を第2表に示す。尚、表中の(−)は生育阻害のないことを示し(++)は全ての細胞が死滅することを示す。

第2表 トリコスタチンAの癌細胞生育阻害効果

濃 度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	フレンド白血病細胞	
	トリコスタチンA	
0	−	
0.5	++	
2.5	++	
10.0	++	

第2表より明らかかな如く、トリコスタチンAはフレンド白血病細胞に對して顯著な細胞生育阻害効果を示し、フレンド白血病細胞に細胞毒性を示すことが明らかになった。

(2) M-MSV Balb 3T3 細胞に対する効果

次に、M-MSV ウィルスでトランスフォームした

(3) ヒト子宮頸癌細胞 HeLa に対する作用

MEM メルベッコ粉末培地 (Gibco 社製) 1 g を 100 ml の二液蒸留水に溶解した後、0.14 g の NaHCO₃ を加え溶解し、ミリポアフィルター (0.22 μ) で沪過し、これに牛胎児血清 (Flow Lab. 社製) 1.1 ml を加えた培地に、予め、37°C 5% CO₂ 存在下3日間培養した HeLa 細胞 (Gey, Kubicek and Coffman Cancer Res., 12, 264 (1952)) を 5×10^4 cells/ml になる様に分歎させ、その培地 0.2 ml ずつマイクロプレート (Nunc 社製 96穴) に分歎し、3時間 5% CO₂ 存在下37°C で培養した。これに 0 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になる様にトリコスタチンA₅日間培養した。その後生育量をトリパンブルー染色法により生存細胞を計測して求めた。第4表より明らかかな如く、トリコスタチンAは HeLa 細胞に對して顯著な細胞生育阻害効果を示し、HeLa 細胞に細胞毒性を示すことが明らかになった。したがってトリコスタチンAは HeLa 細胞に對し、細胞毒性を与えることがわかる。

第 3 表

濃 度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	M-MSV-Balb 3T3 細胞	
	トリコスタチンA	
0	−	
0.5	++	
2.5	++	
10.0	++	

第3表より明らかかな如く、トリコスタチンAは M-MSV-Balb 3T3 細胞に對し顯著な細胞生育阻害効果を示し、M-MSV-Balb 3T3 細胞に細胞毒性を示すことが明らかになった。

第 4 表

濃 度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	HeLa 細胞	
	トリコスタチンA	
0	−	
0.14	+	
0.44	++	
1.38	+++	
8.75	+++	

細胞生育阻止効果: +++ 完全な細胞死滅
判定基準: +++ 生育量は無添加の20%以下
++ 生育量は無添加の20~50%
+ 生育量は無添加の50~90%
− 生育量は無添加と同じ

(4) ヒト白血病細胞 HL-60, ML-1K に対する作用

RPMI-1640 粉末培地 (Gibco 社製) 1 g を 100 ml の二液蒸留水に溶解した後、0.14 g の NaHCO₃ を加え溶解し、ミリポアフィルター (0.22 μ) で沪過し、これに牛胎児血清 (Flow Lab. 社製) 1.1 ml を加えた培地に、予め 37°C, 5% CO₂ 存在下で

特開昭60-199520(5)

3日間培養した HL-60 細胞 (Collins, et al., Nature, 270, 347-349 (1977)) および ML-1 細胞 (J. Minowada, et al., International Symposium on New Trends in Human Immunology and Cancer Immunotherapy pp 188-199 (1980)) をそれぞれ 5×10^4 cells/ml になるように分歎させその培地 0.2 ml ずつマイクロプレート (Nunc 社製 96 穴) に分注し、3時間 5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。これに 0 ~ 500 μg/ml の濃度になるようにトリコスタチン A を添加し 5 日間培養した。その発生重量をトリパンブルー染色法により生存細胞を計測して求めた。第 4 表に示す基準により細胞生育阻害度を示したのが第 5 表である。

第 5 表

細胞	濃度 (μg/ml)	トリコスタチン A
HL-60	0	-
	0.63	+
	1.89	++
	5.80	+++
	16.50	+++

ことができる。本発明に使用する前記有効成分はかかる治療を必要とする患者（動物およびヒト）に対して患者当たり 0.2 ~ 500 mg の用量範囲で一般に数回に分けて從って 1 日当たり 1 ~ 2000 mg の全日用量で投与することができる。用量は病気の重さ、患者の体重および当該者が認める他の因子によって変化させる。

本発明に使用する前記物質は生理学的に認められるベヒクル、担体、賦形剤、結合剤、防腐剤、安定剤、香料などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和される。これらの組成物または製剤における活性物質の量は指示された範囲の適当な用量が得られるようになるものである。

緩衝剤、カプセル剤などに混和することができる具体的な薬剤は次に示すものである：トラガント、アラビアゴム、コーンスターーチまたはセラチンのようないわゆる結合剤；吸湿性セルロースのような賦形剤；コーンスターーチ、油セラチン化デンプン、アルギン酸などのような膨化剤；ステアリン酸マグネシ

ML-1	0	-
	10.0	+
	20.0	++
	39.5	+++
	77.5	+++

第 5 表から明らかなどく、トリコスタチン A は HL-60 細胞および ML-1 細胞に対して顕著な細胞生育阻害効果を示し、HL-60 細胞および ML-1 細胞に対して細胞毒性を示すことが明らかになった。

以上の結果よりトリコスタチン A は癌細胞の生育を阻害することが明らかになり有効な抗腫瘍剤となり得る。

本発明の構造式 [1] で示される物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤はヒトに包含される座標哺乳動物を治療する抗腫瘍剤として有用であり、そして経口投与として錠剤、カプセル剤またはエリキシル剤のような調剤または非経口投与として無菌密閉剤または座標散剤で処方することによって生体中の腫瘍を抑制せしめるために利用する

ウムのような潤滑剤；シロ糊、乳糖またはサッカリンのような甘味剤；ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香料、調剤単位形態がカプセルである場合には上記のタイプの材料にさらに油脂のような液状組合を含有することができる。種々の他の材料は被覆剤としてまたは調剤単位の物理的形態を別な方法で変化させるために存在させることができる。例えば錠剤はシェラック、砂糖またはその両方で被覆することができる。シロップまたはエリキシルは活性化合物、甘味剤としてシロ糊、防腐剤としてメチルおよびプロピルパラベン、色素およびチェリーまたはオレンジ香味のような香料を含有することができる。

注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、ゴマ油、ヤシ油、落花生油、綿葉油などのような天然産出植物油またはエチルオレイン酸などのような合成脂肪ベヒクルを溶解または溶解させる通常の製剤実施に従って処方することができる。緩衝剤、防腐剤、酸化防止剤などが必要に応じて結合することができる。

4 図面の簡単な説明

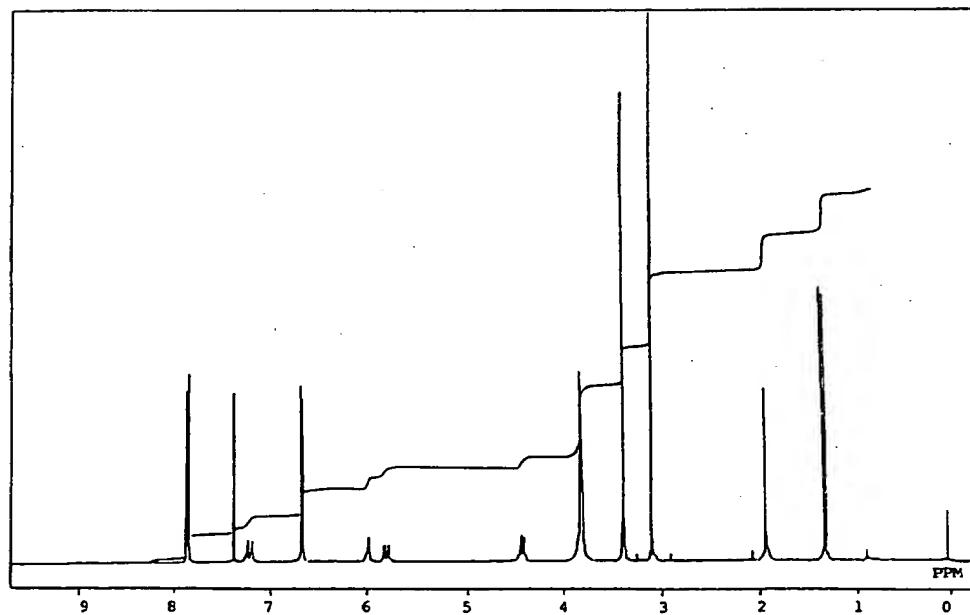
第1図はトリコスタチンAの¹H-NMRスペクトラムである。

第2図はトリコスタチンAの¹³C-NMRスペクトラムである。

出 願 人

味の素株式会社

第1図



第2図

